

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Tereza Kratochvílová

3. ročník, Biologie

Role makrofágů a oxidu dusnatého v interakci leishmanie – flebotomus – hostitel

Macrophages and nitric oxide in leishmania – sandfly – host interactions

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Iva Rohoušová, Ph. D.

Praha 2010

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím uvedené literatury.

V Praze dne 27.4.2010

Tereza Kratochvílová

Poděkování

Tímto děkuji RNDr. Ivě Rohoušové, Ph. D. za odborné konzultace a vedení při vypracování této bakalářské práce. Dále bych touto cestou chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu a trpělivost při mém vysokoškolském studiu na Univerzitě Karlově v Praze a při psaní této bakalářské práce.

Seznam použitých zkratk

AMP	adenosinmonofosfát
APC	buňka prezentující antigen (antigen-presenting cell)
BALB/c	inbrední kmen myši citlivý k nákaze leishmaniemi
CaH-T6J	inbrední kmen myši resistantní k nákaze leishmaniemi
CBA	inbrední kmen myši resistantní k nákaze leishmaniemi
C3H	inbrední kmen myši resistantní k nákaze leishmaniemi
C57Bl/6	inbrední kmen myši resistantní k nákaze leishmaniemi
DBA/2	inbrední kmen myši středně citlivý k nákaze leishmaniemi
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
eNOS	endoteliální NO syntasa
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
GIPL	glykoinositol fosfolipid (glycoinositol phospholipid)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů (granulocyte monocyte colony stimulating factor)
gp	glykoprotein
IFN- γ	interferon gama
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
iNOS	inducibilní NO syntasa
<i>L.</i>	<i>Lutzomyia</i>
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
LPG	lipofosfoglykan (lipophosphoglycan)
LPS	lipopolysacharid
MAX	maxadilan
MF1	inbrední kmen myši, prvně vytvořený mutant s nefunkčním genem pro iNOS
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NK	přírození zabíječi (natural killers)
nNOS	neuronální NO syntasa
NOS	NO syntasa
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
PG	fosfoglykan (phosphoglycan)
Tc	cytotoxické T lymfocyty
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	pomocné T lymfocyty (helper T lymphocyte)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
Treg	regulační T lymfocyty

Abstrakt

Leishmanie po vstupu do svého hostitele osidlují fagolysozomy makrofágů, kde se množí a následně infikují další makrofágy, popř. jiné buňky. Hlavním efektorovým mechanismem na eradikaci leishmanií, kterými jsou některé savčí buňky vybaveny, je syntéza reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku. Velký význam má oxid dusnatý vznikající při metabolické přeměně L-argininu za katalýzy NO syntasy. Kromě cytotoxické funkce se NO podílí např. v signalizačních drahách pro neurotransmisi (nNOS) nebo vasorelaxaci (eNOS). Ne všechny makrofágy mají schopnost produkovat NO (iNOS), jelikož se jedná o heterogenní skupinu lišící se imunologickou funkcí i fyziologií. Skupina klasicky aktivovaných makrofágů představuje účinné APC schopné efektivního zabíjení intracelulárních patogenů. Kromě NO sekretují i prozánětlivé cytokiny, které rozvíjejí imunitní reakci dále směrem k Th1. Naproti tomu skupina alternativně aktivovaných makrofágů není schopná efektivní prezentace antigenu ani produkce NO, ale produkují L-ornithin, který je prekursorem polyaminů, jenž leishmanie využívají pro svůj intracelulární růst. Na myším modelu odpovídá stav resistance/citlivosti k leishmaniose polarizaci směrem k Th1/Th2 imunitní odpovědi. U leishmanií se během evoluce vyvinuly prostředky, které jsou schopné syntézu NO inhibovat. Jsou jimi povrchové glykoproteiny leishmanií. Svou úlohu při virulenci leishmanií hraje i jejich přenašeč – flebotomus. Sliny flebotomů a jejich účinné složky modulují imunitní odpověď hostitele a inhibují některé funkce makrofágů. Fenomén slin podporující přežívání leishmanií v hostiteli se nazývá enhancing efekt.

Klíčová slova

Oxid dusnatý, NOS, makrofág, leishmanie, Th1, Th2, flebotomus, sliny, LPG, GIPL

Abstract

Leishmania reside fagolysosome of macrophages immediately after their entry to host where they multiply and consequently infect other macrophages or eventually other cells. A synthesis of a reactive reactant of oxygen and nitrogen is one of the mechanisms that some mammal cells are equipped with and that also contributes to eradication of leishmania. Nitric oxide rising during a metabolic change of L-arginine under the catalysis of NO synthase is of a large importance. Beyond cytotoxic function, nitric oxide is involved in signalling pathways for a neurotransmission (nNOS) and vasorelaxation (eNOS). Not all types of macrophages have ability to produce NO (iNOS). It is a heterogeneous group differing in immunological function and also in physiology. A group of classical activated macrophages represents an effective APC capable of efficient killing of intracellular pathogens. In addition to NO, they also secrete an inflammatory cytokines, which evolve an immune reaction towards to Th1. Contrary to this, a group of alternative activated macrophages is not capable of any efficient antigen presentation and nitric oxide production but produces L-ornithine, which is a precursor of polyamines, which leishmania utilizes for its own intracellular growth. For the mouse model, status of resistance and/or susceptibility of leishmaniosis refers to a polarization towards to Th1/Th2 immune response. New resources for inhibition of nitric oxide synthesis were evolved in leishmania during the evolution. All this is enabled because of glycoproteins present on body surface of leishmania. A vector - phlebotomus also plays an important role in a virulency by leishmania. Saliva of phlebotomus modulate immune response of a host and inhibit some functions of macrophages. A phenomenon of saliva supporting survival of leishmania in a host is called as enhancing effect.

Key words

Nitric oxide, NOS, macrophage, leishmania, Th1, Th2, Phlebotomus, saliva, LPG, GIPL

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Charakteristika leishmanií.....	5
3. Charakteristika flebotomů.....	7
4. Imunitní reakce (Th1 versus Th2).....	7
5. Makrofágy.....	9
5. 1. Oxid dusnatý (NO).....	11
5. 2. Antiparazitární efekt NO u leishmanií.....	12
5. 3. Obcházení hostitelské imunity parazitem.....	14
5. 4. Enhancing efekt slin flebotomů.....	17
6. Závěr.....	22

1. Úvod

Paraziti představují evolučně úspěšnou skupinu, která vyvíjí účinné zbraně proti efektorovým mechanismům hostitele. Jednou z úspěšných skupin jsou i leishmanie. Manipulace vektorem, modulace imunitní odpovědi hostitele nebo rozšíření flebotomů schopných přenosu leishmanií jsou faktory přispívající k úspěšnému přežívání a rozšiřování leishmanií. Leishmanie a jimi působené onemocnění se podle Světové zdravotnické organizace řadí mezi 10 nejrozšířenějších infekčních chorob světa (WHO, 2010). Molekulární, imunologické i medicínské obory věnují tomuto závažnému onemocnění velkou pozornost a spojují dohromady jednotlivé poznatky o vztahu mezi leishmanií (parazitem), flebotomem (vektorem) a savčím hostitelem, s vidinou možného vyvinutí účinné vakcíny.

Leishmanie mohou osidlovat v savčím hostiteli makrofágy, dendritické buňky, fibroblasty, ale i neutrofily. Hlavní cílovou buňkou, kde se mohou úspěšně množit, jsou však především makrofágy, které jsou hlavním tématem této bakalářské práce.

V předložené bakalářské práci jsem se pokusila shrnout dosavadní poznatky o schopnosti leishmanií přežít v hostitelských buňkách a zároveň popsat schopnost makrofágů leishmanie eradikovat se zaměřením na aktivaci makrofágů, která tvoří křižovatku mezi přežitím a degradací leishmanií. Zvolení jedné ze dvou cest, kterými jsou arginasová dráha nebo dráha vedoucí k produkci NO, se stává rozhodující pro průběh infekce.

NO je plynný radikál syntetizovaný makrofágy (klasicky aktivovanými), který má mikrobicidní účinky schopné eradikovat leishmanie. Naproti tomu alternativně aktivované makrofágy nejsou schopné syntézy NO. Namísto toho produkují močovinu a L-ornithin, který je leishmaniemi využíván pro jejich intracelulární růst. Práce se věnuje i cytokinům a jejich roli při aktivaci nebo inhibici produkce NO.

2. Charakteristika leishmanií

Rod *Leishmania* se fylogeneticky řadí do:

Říše: Protista

Kmen: Euglenozoa

Třída: Kinetoplastea

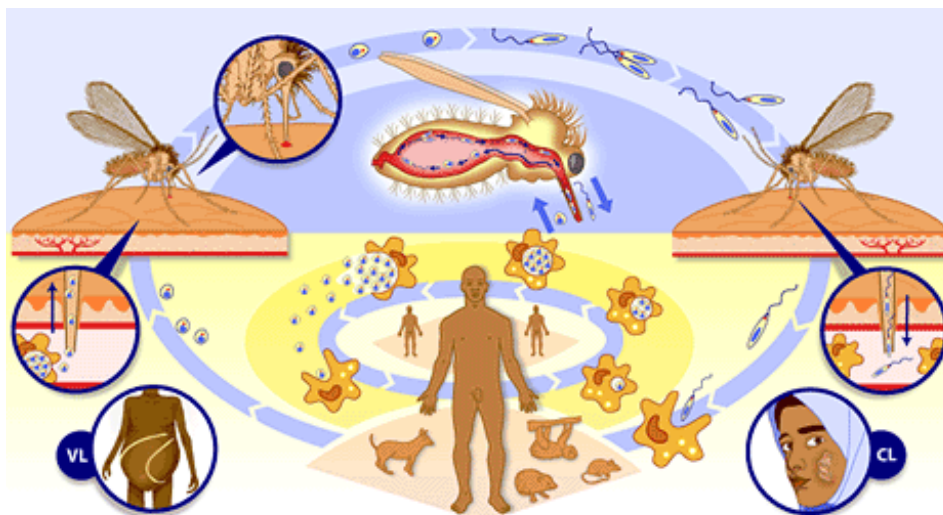
Řád: Trypanosomatida

Leishmanie jsou parazitičtí prvoci způsobující onemocnění nazývané leishmaniasa. Vyskytují se ve dvou formách. V přenašeči nacházíme extracelulární bičíkatou (flagelární) formu nazývanou promastigot. V definitivním hostiteli se vyskytuje jako obligátně intracelulární bezbičíkatý amastigot (Sharma et al., 2008; Bates and Rogers, 2004).

Životní cyklus začíná během sání samice flebotoma na infikovaném hostiteli. Spolu s krví nasává infikované makrofágy s amastigoty, kteří se ve vektorovi brzy transformují na procyklické promastigoty. Ve flebotomovi lze rozeznat několik postupně se transformujících stádií podle morfologických znaků a podle lokalizace v zažívacím traktu flebotoma. Posledním stádiem jsou metacyklickí promastigoti, kteří se stávají infekční pro dalšího hostitele, čímž se celý cyklus přenosu uzavírá. Flebotomus infikovaný leishmaniemi zůstává infikovaný po zbytek svého života (Bates and Rogers, 2004).

Počet leishmanií potřebných pro vyvolání infekce nelze jednoznačně určit. Inokulační dávka se udává v rozmezí 10 – 1000 metacyklických promastigotů během jednoho sání. Záleží na mnoha aspektech (např. na kombinaci hostitel/vektor/parazit, na imunitním stavu hostitele a mnoha dalších) (Bates and Rogers, 2004).

Metacyklickí promastigoti inokulovaní do savčího hostitele jsou fagocytováni přímo makrofágy nebo zprostředkovaně přes neutrofile, což je označováno jako hypotéza „trojského koně“ (Laskay et al., 2003). Uvnitř makrofágů osidluje fagolysosom, kde se mohou úspěšně množit a následně infikovat další makrofágy, popř. jiné buňky typu DC nebo fibroblasty (Naderer and McConville, 2008).



Obr. 1: Schéma životního cyklu leishmanií (převzato z WHO, <http://www.who.int/tdrold/diseases/leish/images/lifecycle-big.gif>)

Bylo popsáno okolo 21 druhů leishmanií patogenních pro člověka, které způsobují různé klinické formy leishmaniosy: kožní, kožně-slizniční nebo viscerální. Každý druh leishmanie má unikátní epidemiologické schéma – lišící se vektory, rezervoáry i geografickým rozšířením. Leishmaniosou jsou nejčastěji nakaženi zvířata a lidé, kteří vstoupí do ohniska nákazy. Leishmaniosa může být zoonosou, pokud je rezervoárem zvíře, nebo antroponosou v případě člověka jako rezervoáru (Kamhawi, 2006). Ohniska nákazy se vyskytují na území 88 států, z toho se 22 vyskytuje v Novém Světě a 66 ve Starém Světě (WHO, 2010).

V případě kožní leishmaniosy zůstávají infikované makrofágy v oblasti kůže, kde se následně tvoří léze. V případě viscerální leishmaniosy, známé také pod názvem kala-azar, se dostávají dále do jater, sleziny a kostní dřeně. Kožně-slizniční forma má počáteční projevy jako kožní leishmaniosa (tvorba vředu), ale nákaza se rozšiřuje dále do měkkých tkání a způsobuje deformaci chrupavčitých částí – nejčastěji okolí nosu, úst a ušních boltců (Sharma et al. 2008; Patel and Sethi, 2009).

Přiřazení jednotlivých druhů leishmanií k typům klinických forem není jednoznačné. Záleží na mnoha faktorech, jako např. na kmenu leishmanie a s ním spojené virulence. Obvykle však kožní leishmaniosu způsobuje *Le. major*, *Le. tropica*, *Le. mexicana* a *Le. amazonensis*. Viscerální leishmaniosa se přiřazuje ke komplexu *Le. donovani* (*Le. infantum/chagasi*, *Le. donovani*). V případě kožně-slizniční leishmaniosy jsou patogeny způsobující tuto formu onemocnění *Le. (viannia) braziliensis* a *Le. (viannia) guyanensis* (Sharma et al. 2008).

3. Charakteristika flebotomů

Flebotomové se fylogeneticky řadí do:

Kmen: Arthropoda

Třída: Insecta

Řád: Diptera

Podřád: Nematocera

Čeleď: Phlebotomidae

Flebotomové jsou významní přenašeči nejenom výše zmíněné leishmaniosy, ale také např. bakterie *Bartonella bacilliformis* způsobující tzv. „oroyo fever/verruca peruviana“ v Jižní Americe nebo arboviru způsobující horečku papatači (Sharma et al., 2008; Tesh and Guzman, 1996).

Protozoální onemocnění způsobené leishmaniemi je přenášeno flebotomy – ve Starém Světě to je pomocí rodu *Phlebotomus*, v Novém Světě rodem *Lutzomyia*. Bylo popsáno okolo 600 druhů flebotomů, z nichž cca 10% je schopných přenášet výše zmíněné patogeny. Většina flebotomů je rozšířena v pásu tropů a subtropů, ačkoliv výskyt sahá i do mírného pásu. Jejich habitat je rozsáhlý – od pouští až k deštným pralesům (Sharma et al. 2008; Tesh and Guzman, 1996).

Obě pohlaví flebotomů sají cukerné šťávy, samice navíc sají krev, z níž získávají proteiny nutné pro vývoj vajec. Samice je schopná nasát 0,3 – 0,5 µl krve (Tesh and Guzman, 1996). Z hlediska způsobu sání se flebotomové řadí mezi tzv. thelmofágy (poolfeeders), což znamená, že krev vytéká z cévy rychleji, než flebotom saje, a tím vzniká v místě sání hematom (Sharma et al. 2008). Sání flebotomů je usnadněno díky specifickému složení slin, které obsahují např. vasodilatátor maxadilan nebo enzym apyrasu inhibující agregaci trombocytů (Tesh and Guzman, 1996).

4. Imunitní reakce (Th1 versus Th2)

T lymfocyty mají původ v lymfoidní linii. Lze je rozdělit na 2 populace, podle druhu exprimovaného koreceptoru. Na svém povrchu mohou exprimovat koreceptor CD8, v takovém případě se jedná o tzv. Tc lymfocyty, nebo exprimují molekulu CD4, poté je

označujeme jako Th lymfocyty. Pomocné se nazývají proto, protože jsou prostředníkem při aktivaci makrofágů (jedná se o subpopulaci Th1) nebo B lymfocytů (v tomto případě hovoříme o Th2 subpopulaci). Příslušnost k jedné ze subpopulací je dána typem produkovaných cytokinů. Pro Th1 lymfocyty jsou charakteristické IL-2, IFN- γ a TNF- α . Pro Th2 to jsou IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13 (Abbas et al., 1996; Mosmann et al., 1996).

Dělení Th na subpopulace Th1 a Th2 není ve skutečnosti definitivní. Jsou známy subpopulace Th0, které produkují cytokiny typické pro Th1 i Th2 (Abbas et al., 1996), Treg, které jsou důležité z hlediska autotolerance (Zhu et al., 2010), subpopulace Th3 charakteristické produkcí TGF- β (Zhu et al., 2010), ale také subpopulace Th9 vyznačující se produkcí IL-9, který se mj. uplatňuje při alergických reakcích společně s Th2 (Soroosh and Doherty, 2009). Neméně významná je Th22 imunitní odpověď spojená s produkcí IL-22 a TNF- α , uplatňující se v epidermální imunitě (Eyerich et al., 2009). V neposlední řadě je nutno zmínit nedávno objevenou subpopulaci Th17 (Peck and Mellins, 2010). Mezi tímto velkým množstvím Th imunitních subpopulací často nejsou ostré hranice a dá se předpokládat, že členění není definitivní. Pro účely této bakalářské práce bude dále diskutována pouze Th1 a Th2 imunitní odpověď.

Samotný T lymfocyt se musí nejdříve aktivovat. Th lymfocyt musí rozeznat na povrchu APC, kterou může být např. infikovaný makrofág, MHCgpII. třídy s navázaným peptidem patogenu. Tento samotný signál však není schopen aktivovat Th lymfocyt. Důležitý je druhý, tzv. kostimulační signál. Teprve pak je Th lymfocyt plně aktivován, může proliferovat a diferencovat se. Druhý kostimulační signál mohou zprostředkovat molekuly CD28/CD40L (na povrchu T lymfocytu) po navázání na ligandy CD86, CD80/CD40 (na povrchu APC). Pro kontakt jsou také důležité adhesivní molekuly – např. VLA-4 (Podojil and Miller, 2009).

Obecně se Th1 podílí na buněčné imunitní odpovědi. Cytokiny specifické pro Th1 aktivují cytotoxickou a zánětlivou reakci (Abbas et al., 1996; Mosmann and Sad, 1996). U Th1 imunitní odpovědi dochází k stimulaci makrofágů, které začnou produkovat zvýšené množství IL-12. Tím stimulují Th1 lymfocyty a NK buňky, které produkují IFN- γ , jenž zpětně aktivuje makrofágy. Naproti tomu Th2 cytokiny podporují protilátkovou odpověď (spolupráce s B lymfocty a jejich přeměna na aktivované plasmocyty) (Abbas et al., 1996; Mosmann and Sad, 1996).

Th1 a Th2 sice nejsou zcela antagonistickými (mají společné některé cytokiny, např. IL-3 a faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů – GM-CSF), ale projevuje se u

nich vztah vzájemného potlačování. Příkladem může být IFN- γ , který stimuluje Th1, ale potlačuje Th2 imunitní odpověď. Naopak IL-10 je schopen inhibovat syntézu Th1 cytokinů (Abbas et al., 1996; Mosmann and Sad, 1996). Správná volba mezi Th1 a Th2 je velmi důležitá a její selhání může být pro organismus fatální.

5. Makrofágy

Makrofágy jsou odvozeny od monocytů (myeloidní linie). Spolu s neutrofily, eosinofily a monocyty patří mezi tzv. profesionální fagocyty. Biologickou funkcí makrofágů je migrovat do místa zánětu, kde se setkávají s patogeny a následně je degradují. Aktivované makrofágy inhibují u patogenů např. mitochondriální respiraci (Granger et al., 1980), citrátový cyklus enzymu akonitázy (Drapier and Hibbs, 1986) nebo syntesu DNA (Keller, 1973). Neodstraňují však pouze mikroorganismy, ale také buňky vlastní (poškozené, staré, nefunkční). V lidských játrech jsou makrofágy schopné pohltnout až 10^{11} erytrocytů denně (Klein and Horejsi, 1997).

Aktivované makrofágy nejsou homogenní skupinou. Existují 3 skupiny lišící se imunologickou funkcí i fyziologií. Tato heterogenita byla potvrzena Steinem roku 1992, kdy byly charakterizovány tzv. alternativně aktivované makrofágy. Bylo ukázáno, že se výrazně liší funkcí od klasicky aktivovaných makrofágů (Stein et al., 1992).

Klasicky aktivované makrofágy

Klasicky aktivované makrofágy jsou účinné APC (exprimují na svém povrchu zvýšené množství MHCgpII. a kostimulačních molekul CD86) (Edwards et al., 2006). Jsou to typické buňky schopné účinného zabíjení intracelulárních patogenů prostřednictvím produkce kyslíkatých a dusíkatých radikálů, kam také patří níže zmíněný oxid dusnatý (NO), vznikající jako produkt metabolické dráhy L-argininu za katalýzy NOS. Klasicky aktivované makrofágy sekretují prozánětlivé cytokiny, které rozvíjejí imunitní reakci dále směrem k Th1 (Edwards et al., 2006).

Pro aktivaci makrofágů je důležitá interakce s Th1 buňkami, kde makrofág vykonává funkci APC. Na svém povrchu prezentuje fragmenty peptidů pohlčeného patogenu v asociaci s MHCgp II. třídy. Takovéto uspořádání je prezentováno prekursorům Th1 pomocných buněk. Makrofág zároveň produkuje stimulační cytokiny IL-1 a IL-12, čímž aktivuje Th1

buňky. Takto aktivované Th1 lymfocyty produkují další významný cytokin IFN- γ , který zpětně aktivuje makrofágy (Goerdet et al., 1999). Th1 buňky nejsou jedinými elementy, které mohou aktivovat makrofágy. Velmi podobnou funkci mají i NK buňky (Mosmann and Sad, 1996).

Kyslíkaté a dusíkaté produkty ale mohou způsobit i poškození vlastní tkáně, proto musí být tyto děje pod silným regulačním tlakem. Nejvýznamnějšími imunoregulačními cytokiny, které tlumí aktivitu makrofágů, jsou TGF- β a IL-10 (Mosser, 2003). Proto jsou myši, postrádající kterýkoliv z těchto dvou cytokinů, citlivé k zánětlivým onemocněním (Mosser, 2003; Reed, 1999).

Alternativně aktivované makrofágy

Tyto buňky se diferencují v přítomnosti Th2 cytokinů jako jsou IL-4 a IL-13. Na rozdíl od klasicky aktivovaných makrofágů postrádají schopnost účinné prezentace antigenu (jen minimálně exprimují MHCgpII a kostimulační molekuly CD86) a produkce NO (Edwards et al., 2006).

Alternativně aktivované makrofágy syntetizují složky extracelulární matrix (Gratchev et al., 2001) a podporují fibrogenesi z fibroblastoidních buněk (Song et al., 2000). Předpokládá se proto, že hlavní funkcí není cytotoxické zabíjení mikroorganismů, nýbrž hojení tkání a imunosuprese. Nejsou schopné prezentace antigenu, z čehož se odvíjí inhibiční účinek na proliferaci T lymfocytů (Schebesch et al., 1997).

Metabolická dráha L-argininu se u alternativně aktivovaných makrofágů liší od dráhy klasicky aktivovaných makrofágů. U alternativně aktivovaných makrofágů je tato dráha katalyzována enzymem arginasa za vzniku L-ornithinu a močoviny. Ornithin je prekursorem kolagenu a polyaminů, které podporují intracelulární růst parazitů (Iniesta et al., 2001). Kropf et al. (2005) prokázali, že indukce arginásové aktivity a tím spojená produkce polyaminů hraje významnou roli v regulaci leishmaniosy (Kropf et al., 2005). Arginásová aktivita je posílena působením cytokinů typických pro Th2 – IL-4, IL-10 (Corraliza et al., 1995), ale také IL-13 (Munder et al., 1998). Mezi oběma základními drahami se vyskytuje regulace negativní zpětné vazby (boj o substrát) (Munder et al., 1998).

Typ II aktivované makrofágy

Jejich název je odvozen od jejich role v Th2 adaptivní imunitní odpovědi, což znamená, že se podílejí spíše na humorální imunitní odpovědi. Zatímco klasicky aktivovaný

makrofág stimuluje T lymfocyty k produkci $\text{IFN-}\gamma$ v odpovědi na antigen, typ II aktivovaného makrofágu indukuje T lymfocyty k produkci IL-4. U klasicky aktivovaného makrofágu je majoritně produkovaným cytokinem IL-12, zatímco u II aktivovaných makrofágů to je IL-10 (Anderson and Mosser, 2002a, b). Produkce IL-10 dělá z tohoto typu makrofágů silné protizánětlivé buňky (Edwards et al., 2006).

Typ II aktivovaných makrofágů je schopen stejně jako klasicky aktivované makrofágy produkovat NO, čímž se výrazně odlišuje od alternativně aktivovaných makrofágů (Edwards et al., 2006).

5. 1. Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý (NO) je reaktivní plynný radikál. Je syntetizován jako nejmenší bioaktivní produkt savčími buňkami, kde hraje úlohu v buněčné komunikaci, zahrnující signály pro neurotransmisi, vasorelaxaci a cytotoxicitu (Domenico, 2004; Klein and Horejsi, 1997).

NO je syntetizován spolu s vedlejším produktem L-citrulinem z L-argininu (nikoli z jeho enantiomeru D-argininu) a kyslíku za katalýzy NO syntasy a za přítomnosti NADPH a tetrahydropterinu (BH_4) jako kofaktorů. NO je velmi nestálá molekula, která má poločas rozpadu mezi 3 a 15 s, proto je ve vzorcích měřena přes své stabilnější oxidativní produkty – nitrit (NO_2^-) a nitrát (NO_3^-) (Kupkova and Benes, 2004; Mungrue et al., 2003).

NO syntasa (iNOS)

NO syntasa je enzym katalyzující reakci, při které vzniká NO. Pro správnou funkčnost je nutná homodimerizace enzymu (Domenico, 2004; Kupkova and Benes, 2004). Existují 3 isoformy (isoenzymy) : nNOS – exprimována neurony, eNOS – exprimována endoteliálními buňkami a iNOS – exprimována nejčastěji makrofágy (Kupkova and Benes, 2004; Xie et al., 1992).

Tyto 3 formy mají společné strukturní rysy- např. NADPH-, FAD-, FMN- a kalmodulin- vázající domény, ale zároveň se liší v způsobu aktivačních mechanismů. U nNOS a eNOS je produkce NO regulována vtokem Ca^{2+} iontů do buňky, který mění

konformaci kalmodulinu. Ten se váže na NOS, a aktivuje ji k produkci NO (Bredt and Snyder, 1990).

iNOS a s ní spojená produkce NO se vyskytuje u makrofágů, hepatocytů, buněk hladkého svalstva, fibroblastů a některých nádorových buněk. NO je produkován několik hodin po stimulaci cytokiny (IFN- γ , TNF- α) nebo produkty mikrobů (LPS) (Stuehr and Marletta, 1987). Nejedná se tedy o konstitutivní expresi (jako je to u nNOS a eNOS). Tento proces na rozdíl od předchozího nevyžaduje ani Ca²⁺ ani kalmodulin (Stuehr et al., 1991).

5. 2. Antiparazitární efekt NO u leishmanií

Leishmanie jsou injikovány do kůže hostitele, poté jsou fagocytovány buď přímo makrofágy nebo prostřednictvím neutrofilů (teorie Trojského koně) (Laskay et al., 2003). Následně se množí ve fagolysosomech makrofágů, odkud se šíří do dalších buněk – makrofágů, DC nebo fibroblastů (Naderer and McConville, 2008).

Makrofágy infikované *Leishmania major* využívají k zabíjení těchto parazitů L-arginin-dependentního mechanismu (Green et al., 1990; Liew et al., 1990b). Na rozdíl od promastigotů jsou amastigoti méně citliví k oxidačním mikrobicidním mechanismům – např. H₂O₂ (Murray and Cartelli, 1983).

IFN- γ je hlavním aktivátorem makrofágů a následné degradace leishmanií (Murray et al., 1983). Schopnost makrofága, který byl aktivován IFN- γ , zabít intracelulární leishmanie koreluje se vzrůstem koncentrace NO₂⁻. Ukázalo se, že k plné aktivaci makrofágů je zapotřebí dvousložkových aktivačních mechanismů (Ruco and Meltzer, 1978), primárního a sekundárního signálu. Primárním signálem je IFN- γ , jehož signál je zesilován sekundárními signály jako například TNF- α , LPS, muramyl dipeptidem (Drapier et al., 1988) nebo amastigoty leishmanií (zde *Le. major*) (Green et al. 1990). Samotný IFN- γ je také schopný aktivovat makrofágy (indukovat NO₂⁻), ale v kombinaci se sekundárními signály má synergistický účinek (Ding et al., 1988).

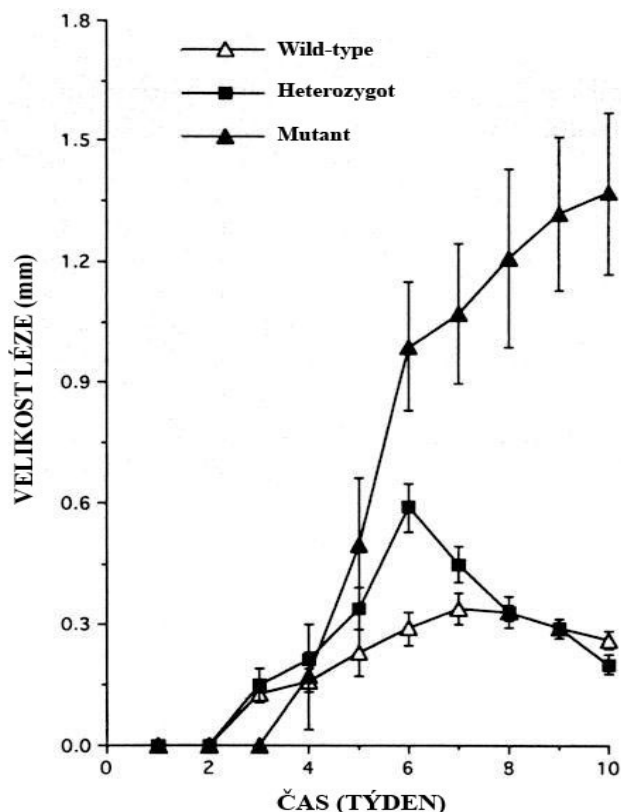
O stavu rezistence či vnímavosti ke kožní leishmanioze rozhoduje příslušnost myšího kmene k jedné ze dvou Th buněčných linií – příslušnost k Th1/Th2 linii (Scott et al., 1988). U rezistentního kmene, jakým je C57Bl/6, je rezistence asociována s přítomností IFN- γ , který produkují Th1 lymfocyty (Heinzel et al., 1989). Naproti tomu vnímavé kmeny, jakým je kmen BALB/c, vykazují Th2 imunitní odpověď a jejich citlivost k leishmanioze je spojena

s přítomností IL-4 (Heinzel et al., 1989). Tvzení o vztahu mezi průběhem onemocnění a produkcí specifických cytokinů podpořil Sadick et al. (1990) pokusem, kdy byla do vnímavé BALB/c aplikována protilátka proti IL-4, což se projevilo ve výrazném zlepšení zdravotního stavu daného myšího kmene (Sadick et al., 1990). Naopak aplikace protilátky proti IFN- γ do původně rezistentního kmene C3H/HeN, vyvolala vnímavost k onemocnění (Belosevic et al., 1989).

Hostitelská obrana proti kožní leishmanioze je zprostředkována i pomocí TNF- α (Titus et al., 1989). TNF- α má schopnost spolupracovat s IFN- γ v obraně proti infekci *Le. major* jak *in vivo*, tak *in vitro*. Makrofágy stimulované kombinací těchto cytokinů byly více účinné v zabíjení tohoto intracelulárního parazita (tvořily se u nich menší léze) než stimulace samotným IFN- γ nebo samotným TNF- α (Liew et al., 1990a), což potvrzuje výše zmíněnou teorii dvousložkových aktivačních mechanismů. Další otázkou bylo, zda-li množství produkovaného TNF- α nějakým způsobem koreluje s citlivostí/rezistencí k *Le. major*. Ukázalo se, že resistantní kmeny myší C3H a CBA produkují po infekci *Le. major* signifikantně více TNF- α v porovnání s kmenem BALB/c, kde syntéza TNF- α nebyla detekována (Liew et al., 1990c; Titus et al., 1989). Naproti tomu aplikací protilátky proti TNF- α došlo k výraznému rozvoji lézí. Z toho vyplývá, že TNF- α má schopnost účinně bránit rozvoji kožní leishmaniosy. Zároveň bylo zjištěno, že redukce velikosti lézí odpovídá i snížení počtu parazitů v lézi, z čehož se usuzuje, že TNF- α má také inhibiční vliv na replikaci *Le. major* (Titus et al., 1989).

Pro rozvoj Th1 imunitní odpovědi je zapotřebí i IL-12, který je s produkcí IFN- γ úzce spjatý. Do BALB/c byl opakovaně injikován rekombinantní IL-12, který byl schopen snížit počet parazitů (Heinzel et al., 1993; Sypek et al., 1993). Zároveň bylo prokázáno, že IL-12 by mohl být odpovědný za rezistenci u myší C57Bl/6. Aplikování protilátky proti IL-12 do geneticky rezistentních myší C57Bl/6 mělo za následek očekávané podlomení rezistence (Sypek et al., 1993).

Roku 1995 byla pro důkaz funkce NO v obraně proti leishmaniím vytvořena iNOS-deficientní myš (Wei et al., 1995). Jednalo se o homozygotní myši (kmen MF1), které byly srovnávány s tím samým kmenem, ale bez poruchy genu pro iNOS (wild-type) a s heterozygoty (taktéž s funkčním genem). Peritoneální makrofágy z heterozygotních myší produkovaly po stimulaci IFN- γ a LPS značné množství NO, naproti tomu makrofágy z mutantních myší v produkci selhávaly. Oproti homozygotům byli heterozygoti a wild-type schopni leishmanie eradikovat (Wei et al., 1995).



Obr. 2: Důkaz role oxidu dusnatého v obraně proti leishmaniose, vytvoření mutantní myši s poruchou genu pro iNOS (převzato z Wei et al., 1995, upraveno).

5. 3. Obcházení hostitelské imunity parazitem

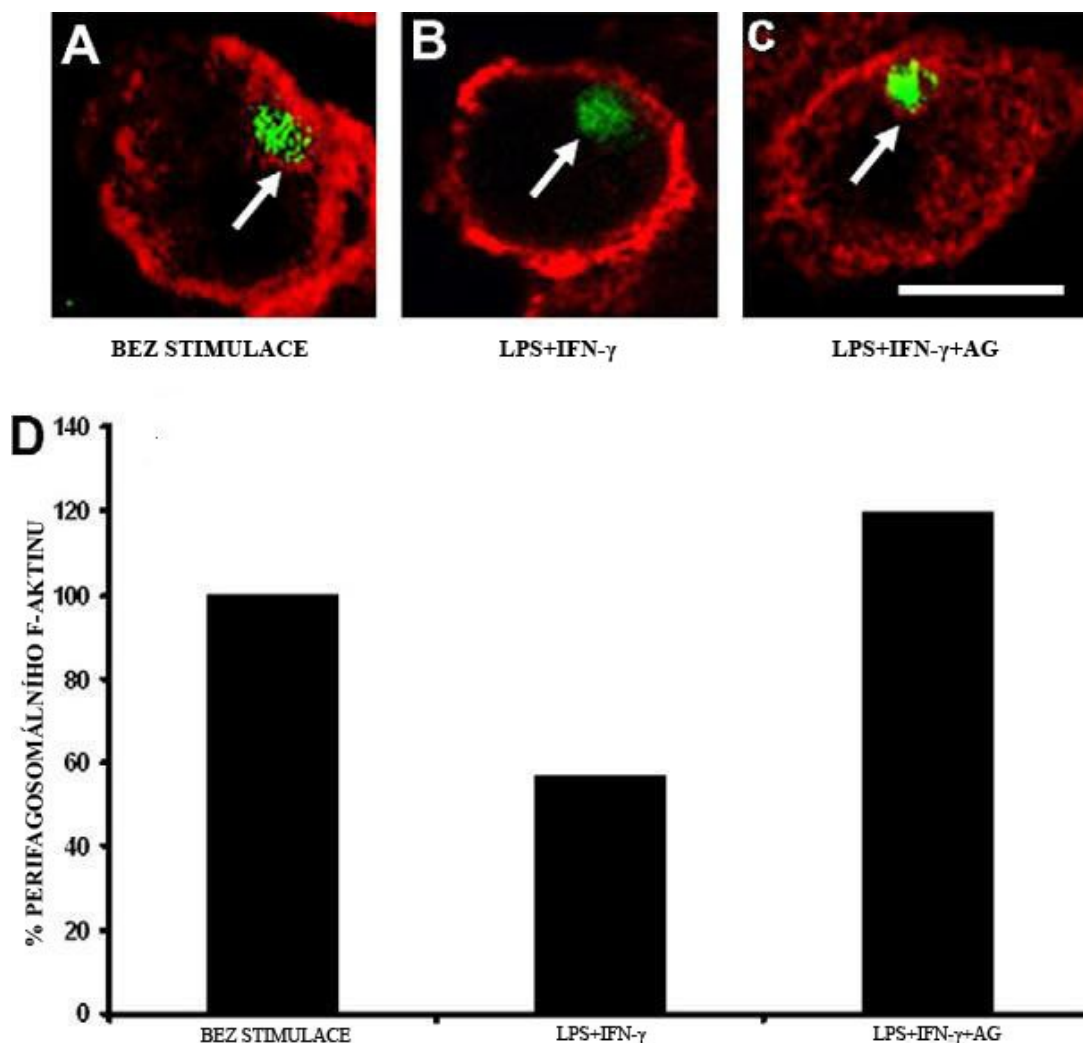
Úspěšnost přežití leishmanií v tak nehostinných podmínkách jako je zažívací trakt flebotomů nebo fagolysosom makrofágů je dána přítomností specifických glykokonjugátů na povrchu těchto parazitů. Tyto molekuly jsou velmi důležité pro interakci parazit – vektor – hostitel. Jsou potřebné pro vývoj v hmyzím vektorovi i v savčím hostiteli (McConville and Ferguson, 1993; Volf and Myskova, 2007). Na povrchích leishmanií převažují dva typy glykokonjugátů – lipofosfoglykany (LPG) a nízkomolekulární glykoinositol-fosfolipidy (GIPL) (Liew et al., 1997; Ropert and Gazzinelli, 2000).

LPG je produkován především promastigoty. McConville et al. (1991) popsali, že LPG promastigotů *Le. donovani* je exprimováno v množství přibližně $6 \cdot 10^6$, zatímco u amastigotů byla exprese LPG silně redukována (McConville and Blackwell, 1991). Promastigotům slouží jako ligand pro adsorpci na makrofágy - ať již přímo přes lektinové receptory makrofágů (Handman and Goding, 1985), nebo zprostředkovaně přes

komplementové receptory (Blackwell et al., 1985). Zároveň je chráněn před lytickou degradací komplementem. Přestože se lytický komplex C5b – 9 utvoří, nedosáhne až k membráně parazita (Puentes et al., 1990).

LPG chrání promastigoty i v nepříznivém prostředí fagolysozomu makrofága (Handman et al., 1986), kde má schopnost inhibovat oxidativní vzplanutí (Frankenburg et al., 1990). Má schopnost regulovat expresi iNOS i produkci NO v závislosti na přítomnosti IFN- γ (Proudfoot et al., 1996). Pokud byl fragment PG (aktivní složka LPG) přidán ve stejnou dobu jako stimulant IFN- γ , pak byla produkce NO zvýšena. Naproti tomu, pokud byl PG přidán do kultury několik hodin před stimulací IFN- γ , byla syntéza NO značně inhibována. Stupeň inhibice byl zároveň závislý na koncentraci podaného PG (Proudfoot et al., 1996).

LPG má dále schopnost inhibovat fagosomální maturaci, proces, při kterém dochází k fúzi fagosomu s lysozomem (Holm et al., 2001). Desjardins et al. (1997) popsali, že pomocí této inhibice se promastigoti *Le. donovani* účinně vyhýbají negativnímu působení hydrolytických enzymů a volných radikálů (Dermine et al., 2000; Desjardins and Descoteaux, 1997). Inhibice fagosomální maturace koreluje s inhibicí normálního formování F-aktinu kolem fagosomu. V přítomnosti leishmanií se kolem fagosomu hromadí F-aktin, který slouží jako bariéra pro fúzi fagosomu s lysozomem (Holm et al., 2001). Bylo popsáno, že regulátorem fagosomální maturace je NO. U makrofágů stimulovaných LPS a IFN- γ se vytvářelo kolem fagosomu signifikantně méně F-aktinu (nedocházelo k inhibici fagosomální maturace) v porovnání s nestimulovanými makrofágy (Winberg et al., 2007). Z toho vyplývá, že na zlikvidování parazita nemusí být použita jen klasická cesta přímým mikrobicidním působením NO, ale existují i další možnosti, jak oslabit parazita – zachováním fagosomální maturace.



Obr. 3: Oxid dusnatý – regulátor fagosomální maturace
(převzato z Winberg et al., 2007, upraveno).

(AG – aminoguanidin, blokátor aktivity iNOS; zeleně jsou vyznačeni promastigoti *L. donovani*, červeně je vyznačen F-aktin)

Jak již bylo zmíněno, druhou významnou povrchovou molekulou leishmanií je GIPL. Na rozdíl od LPG je GIPL silně exprimován jak na povrchu promastigotů, tak na povrchu amastigotů. Bylo zjištěno, že některé molekuly GIPL slouží jako prekursor pro LPG (McConville et al., 1990). Tato molekula výrazně podporuje přežívání leishmanií - prostřednictvím inhibice produkce NO. Makrofágy preinkubované s GIPL a následně stimulované IFN- γ a LPS byly silně inhibovány v produkci NO. Ve srovnání s kontrolami kompletně inhibovaly produkci TNF- α . U makrofágů inhibovaných GIPL nedošlo k aktivaci produkce NO ani po přidání TNF- α (Proudfoot et al., 1995).

Obě tyto molekuly jsou zbraněmi parazitů, pomocí kterých jsou schopni obejít hostitelskou obranu. Tímto způsobem si mohou z míst s nepříznivými podmínkami udělat místo, kde se mohou účinně ukrývat před imunitním systémem hostitele a šířit se dál.

5. 4. Enhancing efekt slin flebotomů

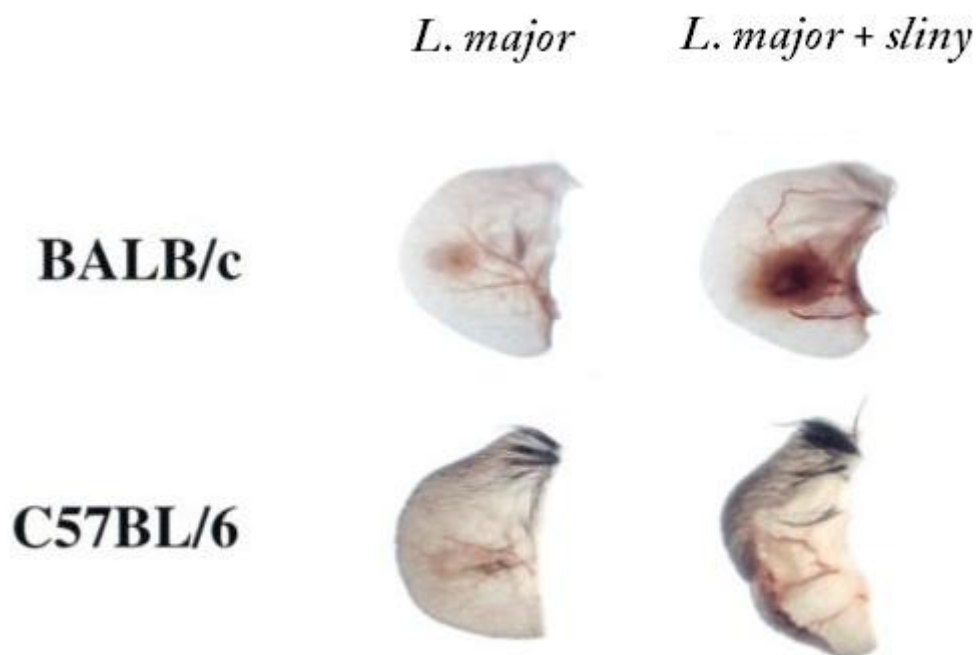
Leishmanie jsou do definitivního hostitele přenášeny vektorem – flebotomem – během sání. Do kůže hostitele jsou spolu s leishmaniemi injikovány sliny flebotoma, které obsahují mimo složek antikoagulačních, vasodilatačních a protizánětlivých také složky modulující imunitní odpověď hostitele (Theodos and Titus, 1993).

Sliny flebotomů mají v případě leishmaniosy výrazný enhancing effect, podporují přežívání leishmanií v savčím hostiteli a zvyšují jejich virulenci. Vyplývá to mimo jiné ze schopnosti inhibovat některé funkce makrofágů, zahrnující např. presentaci antigenu a produkci NO, čímž je výrazně snížena obranná schopnost hostitele eradikovat parazita (Titus et al., 2006; Waitumbi and Warburg, 1998).

V případě kožní leishmaniosy bylo zjištěno, že po přidání lyzátu slinných žláz se léze mnohonásobně zvětšily - v porovnání s kontrolami (bez přidání slinných žláz). Titus et al. (1988) injikovali *Le. major* v přítomnosti slinných žláz *L. longipalpis* do myších kmenů CBA a BALB/c. U obou kmenů se projevil stejný efekt. U myší, do kterých byly aplikovány leishmanie společně se slinnými žlázami, se v porovnání s kontrolami vyvinuly znatelně větší léze, čemuž odpovídal i zvýšený počet parazitů v lézi (Titus and Ribeiro, 1988). Pro představu: pokud bylo do myši injikováno 10^2 leishmanií v přítomnosti $\frac{1}{2}$ slinné žlázy, pak bylo množství parazitů v lézi pět tisíc krát vyšší než u kontrolních myší nakažených pouze leishmaniemi bez lyzátu slin (Titus and Ribeiro, 1988). Stejný efekt byl potvrzen i u dalších dvojic, např. – *L. longipalpis* – *Le. mexicana amazonensis*, *P. papatasi* – *Le. major*, *L. longipalpis* – *Le. major* (Theodos et al., 1991), *L. longipalpis* – *Le. braziliensis braziliensis* (Samuelson et al., 1991), *L. longipalpis* – *Le. donovani chagasi* (Warburg et al., 1994).

Enhancing efekt slinných žláz *Lutzomyia longipalpis* byl testován při nákaze *Le. major* u více myších kmenů (Theodos et al., 1991). Použity byly BALB/c (považovány za geneticky vnímavý kmen), DBA/2 (středně citlivý kmen) a C3H, C57BL/6, CBA/Ca

(geneticky resistantní kmen). Zhoršení kožní léze se objevilo u všech výše zmíněných kmenů, ale s různou intenzitou. Největší léze byly u kmenů C57BL/6 a CBA (Theodos et al., 1991).



Obr. 4: Enhancing efekt slinných žláz flebotomů na průběh leishmaniové infekce (převzato z Kamhawi, 2000, upraveno)

Na dvojici *P. papatasi* – *Le. major* u geneticky resistantních CBA myší bylo popsáno, že enhancing efekt slin flebotomů polarizuje imunitní odpověď směrem k Th2. Produkce cytokinů Th1 imunitní odpovědi (IFN- γ , IL-12) a iNOS byla účinkem slinných žláz inhibována, zatímco Th2 cytokin IL-4 byl produkován ve zvýšeném množství (Mbow et al., 1998). Zároveň bylo zjištěno, že v produkci Th2 cytokinů jako jsou IL-10 a TGF- β k žádné změně nedošlo – koncentrace byly srovnatelné u myší injikovaných lysátem slinných žláz i bez aplikace slin (Mbow et al., 1998). Dále byl proveden experiment, kdy do myší byly injikovány pouze sliny flebotoma (bez *Le. major*) a následně byla po dobu 7 dní měřena exprese mRNA pro IL-4. Bylo zjištěno, že zvýšení exprese IL-4 mRNA je stejné v obou případech – při aplikaci slinných žláz samotných nebo v kombinaci s *Le. major* (Mbow et al., 1998).

Výše zmíněné zákonitosti platné pro případ *Le. major* nemusí platit pro jiný druh leishmanie. Příkladem může být *Le. amazonensis* (Norsworthy et al., 2004). Pokud je dávka inokulovaných leishmanií příliš nízká (nižší než 10^4), pak se enhancing efekt slin *L. longipalpis* neprojeví (Lima and Titus, 1996). Odlišná situace nastává v případě *Le. major*,

kde se jeví jako dostačující infekční dávka 10 parazitů (Rohousova and Volf, 2006; Titus and Ribeiro, 1988). V případě *Le. amazonensis* nebyl pozorován tak vysoký koncentrační růst IL-4, jako bylo v případě *Le. major*. Naopak byl zaznamenán výrazný nárůst IL-10. V tomto případě tedy slinné žlázy *L. longipalpis* zvyšují virulenci *Le. amazonensis* prostřednictvím stimulace IL-10 (Norsworthy et al., 2004).

Jedním z mechanismů, kterým mohou sliny flebotomů podporovat přežití leishmanií je inhibice IFN- γ , který zprostředkovává destrukci leishmanií. Směs slinných žláz *P. papatasi* a *Le. major* byla přidána ke kultuře makrofágů izolovaných z C57BL/6, CBA a CaH-T6J myších kmenů. Po určité době byl přidán IFN- γ . Zjistilo se, že schopnost IFN- γ aktivovat makrofágy byla inhibována. Inhibice IFN- γ odráží inhibici produkce NO. Efekt slin na IFN- γ a z toho vyplývající syntézu NO je závislý na koncentraci – nižší koncentrace INF- γ způsobuje vyšší stupeň inhibice produkce NO (Hall and Titus, 1995).

Sliny flebotomů mohou ovlivňovat i presentaci antigenu makrofágem. U myší (kmeny C3H/H, BALB/c a CBA/T6J) infikovaných *Le. major* bylo zjištěno, že v přítomnosti slinných žláz byla silně snížena proliferační odpověď T-lymfocytů v důsledku snížené schopnosti makrofágů prezentovat leishmaniový antigen (Theodos and Titus, 1993). Zatím není přesně známo, jakým způsobem je presentace antigenu znemožněna, ale v úvahu připadají 4 návrhy – nesprávné zpracování antigenu a transport na buněčný povrch, absence kostimulačních signálů pro aktivaci T-lymfocytů nebo mohou sliny snižovat expresi adhesivních molekul na povrchu infikovaných makrofágů (Theodos and Titus, 1993).

Costa et al. (2004) analyzovali expresi kostimulačních molekul – mj. CD 80, CD86, CD40 u lidských monocytů a makrofágů po přidání homogenátu slinných žláz. Ukázalo se, že sliny *L. longipalpis* mají schopnost snižovat expresi molekul CD80 na povrchu monocytů a makrofágů stimulovaných LPS, což se může odrazit v modifikaci T buněčné odpovědi. Na druhé straně byla zvýšena exprese CD86 (Costa et al., 2004). Je možné, že neefektivní presentace antigenů je způsobena více aspekty najednou.

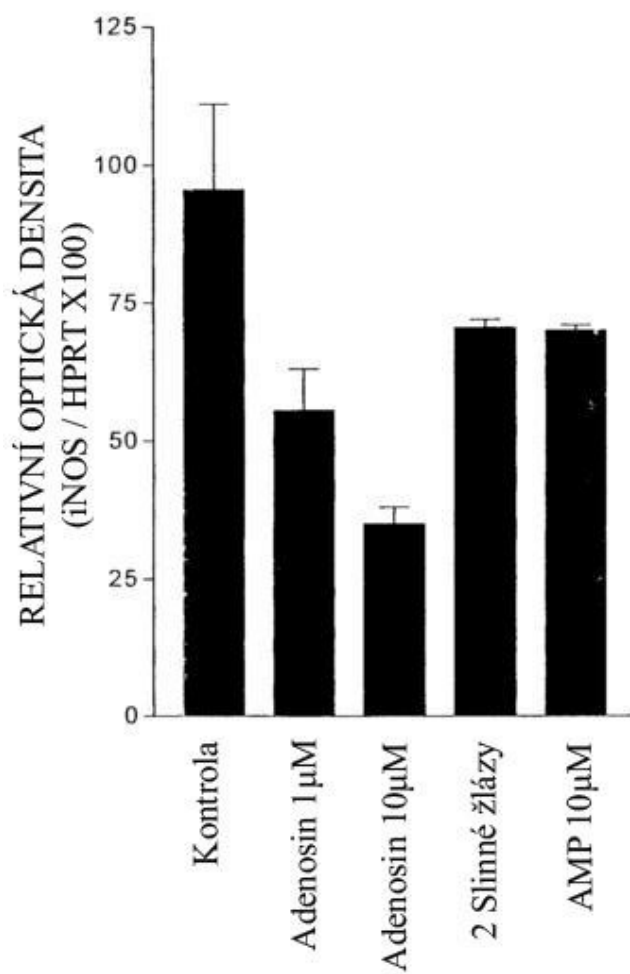
Pokud promastigoti po vstupu do hostitele rychle neosídlí makrofágy, jsou eliminováni NK buňkami, eosinofily nebo neutrofily. Promastigotům mohou pomoci sliny flebotomů, které jsou pro makrofágy chemotaktické (Zer et al., 2001; Anjili et al., 1995; Teixeira et al., 2005). Výsledky byly získány *in vitro* pro peritoneální makrofágy (izolované z BALB/c) inkubované se slinami *P. papatasi*, *P. dubosqi* a *L. longipalpis* (Zer et al., 2001; Anjili et al., 1995). Teixeira et al. (2005) testovali chemotaktický efekt homogenátu slinných žláz *L. longipalpis in vivo* u BALB/c a C57BL/6. Pro detekci chemotakticky přilákaných

makrofágů bylo použito modelu vzduchové bubliny. Zvýšený stupeň chemotaxe zároveň koreloval se zvýšenou expresí chemokinů CCL2/MCP-1. Výsledky tohoto experimentu ukázaly zvýšenou chemotaxi makrofágů po aplikaci slinných žláz u myšího kmene BALB/c, nikoli však u kmene C57BL/6 (Teixeira et al., 2005).

Bylo zjištěno, že sliny *P. papatasi* obsahují silný inhibitor protein-fosfatasy 1 a protein-fosfatasy 2A (Waitumbi and Warburg, 1998). Tyto fosfatasy jsou klíčovými v signalizační dráze, která vede ke spuštění genu pro iNOS v makrofázích, a z toho vyplývající produkci NO (Dong et al., 1995). Složka slinných žláz zodpovídající za tuto inhibici nebyla v té době přesně definována, ale ukázalo se, že je resistentní na působení proteáz i nukleáz (Waitumbi and Warburg, 1998). Později se ukázalo, že za tuto inhibici zodpovídá AMP obsažený ve slinách *P. papatasi* (Ribeiro et al., 1999).

U flebotomů Nového Světa – ve slinách *L. longipalpis* byl detekován silný vasodilátor dříve nazývaný EIF (erythema-inducing factor) (Kamhawi, 2000; Ribeiro et al., 1986), dnes známý pod názvem maxadilan (Kamhawi, 2000; Lerner et al., 1991). Byla u něj popsána schopnost zhoršovat průběh infekce *Le. major* stejnou měrou jako u homogenátu celých slinných žláz *L. longipalpis* (Morris et al., 2001; Rohousova and Volf, 2006). Ukázalo se, že samotný MAX polarizuje Th imunitní odpověď směrem k Th2 (Titus et al., 2006). Následně byl zjišťován vliv MAX na produkci cytokinů a NO u C3H myší (Brodie et al., 2007). Výsledek experimentu ukázal, že MAX inhibuje produkci TNF- α , IL-12p70, z čehož vyplývá inhibice degradace *Le. major*, která přímo koreluje s neschopností makrofágů produkovat NO. Naopak byla posílena produkce cytokinů Th2 imunitní odpovědi IL-10, IL-6 (Soares et al., 1998) a TGF- β (Brodie et al., 2007). Schopnost MAX inhibovat aktivaci T lymfocytů (Morris et al., 2001; Qureshi et al., 1996) a produkci TNF- α (Soares et al., 1998) také přispívá k převaze Th2 imunitní odpovědi.

Na rozdíl od *L. longipalpis*, sliny *P. papatasi* žádný MAX neobsahují, ale přesto se u nich projevuje podobná modulace imunitní odpovědi. Ukázalo se, že obdobnou funkci jako MAX u *L. longipalpis* plní u *P. papatasi* adenosin a AMP (Ribeiro et al., 1999). Podobně jako MAX má adenosin schopnost polarizovat Th imunitní odpověď směrem k Th2. Adenosin inhibuje sekreci IL-12, IFN- γ , TNF- α a NO (Hasko et al., 1996; Hasko et al., 1998; Link et al., 2000), naproti tomu podporuje sekreci IL-10 (Moine et al., 1996). Ve studii Katz et al. (2000) bylo ukázáno, že sliny *P. papatasi* s přibližným množstvím 1 μ M adenosinu snižují expresi genu pro iNOS z 30 – 40% (Katz et al., 2000).



Obr. 5: Role slinných žláz *P. papatasi*, adenosinu a AMP jako inhibitorů iNOS
(převzato z Katz et al., 2000, upraveno)
(HPRT – hypoxantin guanin fosforibosyl transferáza)

6. Závěr

Poznatky o roli makrofágů a NO u dvojice leishmanie – hostitel a ovlivňování tohoto vztahu slinami vektora je široce probíraným tématem, které jsem se pokusila shrnout v předložené bakalářské práci. Tématika metabolismu L-argininu jako rozcestníku směřující k syntéze NO a s ní spojenou možností eradikace leishmanie nebo vedoucí směrem k arginásové aktivitě, jejíž produkty mohou leishmanie využívat pro vlastní intracelulární růst, je jedním z mnoha dílků, jejichž pochopení a propojení s ostatními poznatky by mohly být užitečné při vývoji účinné vakcíny proti leishmaniím.

Leishmanie jsou schopné modulovat imunitní odpověď hostitele. Balance mezi Th1 a Th2 imunitní odpovědí odpovídá průběhu infekce. Leishmanie modulují imunitní odpověď hostitele směrem k Th2, čímž se výrazně komplikuje průběh nákazy. Proto by vakcína zasahující do interakce leishmanie – hostitel měla polarizovat imunitní odpovědi k protektivnímu Th1 typu.

Je známo, že sliny flebotomů zvyšují virulenci leishmanií. Proto se studie zabývající se vývojem vakcíny proti leishmaniím soustřeďují také na roli slin v interakci hostitel - leishmanie. Předpokládá se, že by vakcinace proti modulačním molekulám ve slinách flebotomů mohla blokovat enhancing efekt těchto slin.

Objasňování problematiky role makrofágů a NO na modelu leishmania – flebotomus – hostitel by mělo být hlavním tématem mé diplomové práce. Zaměřila bych se především na vliv slin flebotomů na funkce makrofágů u myší infikovaných *Le. major*. Cílem diplomové práce bude porovnat tento vliv u naivních myší a myší imunizovaných sáním flebotomů. Další pokusy by se měly zabývat zkříženou reakcí, kdy pokusné myši budou imunizované sáním flebotoma jednoho druhu, a následně infikovány leishmaniemi v kombinaci se slinnými žlázami jiného druhu flebotoma. Ráda bych tyto pokusy doplnila o výsledky získané na kultuře tkáňových makrofágů.

Pro detekci NO produkovaného klasicky aktivovanými makrofágy budu používat především Griessovu reakci. Arginásovou aktivitu u alternativně aktivovaných makrofágů zase prostřednictvím měření koncentrace močoviny jako vedlejšího produktu reakce arginasy s L-argininem. Produkci cytokinů budu měřit pomocí proteinové microarray a ELISA metody.

Seznam citací

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793
- Anderson CF, Mosser DM (2002a) A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *Journal of Leukocyte Biology* 72:101-106
- Anderson CF, Mosser DM (2002b) Cutting edge: Biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *Journal of Immunology* 168:3697-3701
- Anjili CO, Mbatia PA, Mwangi RW, Githure JI, Olobo JO, Robert LL, Koech DK (1995) The chemotactic effect of *Phlebotomus-dubosqi* (Diptera, Psychodidae) salivary-gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica* 60:97-100
- Bates PA, Rogers ME (2004) New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine* 4:601-609
- Belosevic M, Finbloom DS, Vandermeide PH, Slayter MV, Nacy CA (1989) Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural-resistance of C3H-HEN mice to infection with *Leishmania-major*. *Journal of Immunology* 143:266-274
- Blackwell JM, Ezekowitz RAB, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S (1985) macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *Journal of Experimental Medicine* 162:324-331
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric-oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:682-685
- Brodie TM, Smith MC, Morris RV, Titus RG (2007) Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infection and Immunity* 75:2359-2365
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M (1995) arginase induction by suppressors of nitric-oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE(2)) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 206:667-673
- Costa DJ, Favali C, Clarencio J, Afonso L, Conceicao V, Miranda JC, Titus RG, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn CI (2004) *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity* 72:1298-1305
- Dermine JF, Scianimanico S, Prive C, Descoteaux A, Desjardins M (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cellular Microbiology* 2:115-126
- Desjardins M, Descoteaux A (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine* 185:2061-2068
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal-macrophages - comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* 141:2407-2412
- Domenico R (2004) Pharmacology of nitric oxide: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Current Pharmaceutical Design* 10:1667-1676
- Dong Z, Yang X, Xie K, Juang S, Llansa N, Fidler IJ (1995) Activation of inducible nitric oxide synthase gene in murine macrophages requires protein phosphatases 1 and 2A activities. *Journal of Leukocyte Biology* 58:725-732

- Drapier JC, Hibbs JB (1986) Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor-cells - inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. *Journal of Clinical Investigation* 78:790-797
- Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB (1988) Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cyto-toxic effector mechanism in murine macrophages. *European Journal of Immunology* 18:1587-1592
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology* 80:1298-1307
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A (2009) Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *Journal of Clinical Investigation* 119:3573-3585
- Frankenburg S, Leibovici V, Mansbach N, Turco SJ, Rosen G (1990) Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity - inhibition by lipophosphoglycan. *Journal of Immunology* 145:4284-4289
- Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodella V, Orfanos CE (1999) Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67:222-226
- Granger DL, Taintor RR, Cook JL, Hibbs JB (1980) Injury of neoplastic-cells by murine macrophages leads to inhibition of mitochondrial respiration. *Journal of Clinical Investigation* 65:357-370
- Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, Goerdts S (2001) Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta IG-H3. *Scandinavian Journal of Immunology* 53:386-392
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania*-major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology* 144:278-283
- Hall LR, Titus RG (1995) Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania*-major and nitric-oxide production. *Journal of Immunology* 155:3501-3506
- Handman E, Goding JW (1985) The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *Embo Journal* 4:329-336
- Handman E, Schnur LF, Spithill TW, Mitchell GF (1986) Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. *Journal of Immunology* 137:3608-3613
- Hasko G, Nemeth ZH, Vizi ES, Salzman AL, Szabo C (1998) An agonist of adenosine A(3) receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *European Journal of Pharmacology* 358:261-268
- Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES (1996) Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *Journal of Immunology* 157:4634-4640
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM (1989) Reciprocal expression of interferon-gamma or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis - evidence for expansion of distinct helper T-cell subsets. *Journal of Experimental Medicine* 169:59-72

- Heinzel FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK (1993) Recombinant interleukin-12 cures mice infected with *Leishmania-major*. *Journal of Experimental Medicine* 177:1505-1509
- Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B (2001) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC alpha and defective phagosome maturation. *Cellular Microbiology* 3:439-447
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Corraliza I (2001) The inhibition of arginase by N-omega-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 193:777-783
- Kamhawi S (2000) The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection* 2:1765-1773
- Kamhawi S (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22:439-445
- Katz O, Waitumbi JN, Zer R, Warburg A (2000) Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62:145-150
- Keller R (1973) Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor-cells in-vitro by nonspecifically activated macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 138:625-644
- Klein J, Horejsi V (1997) *Immunology*, Second edition
- Kropf P, Fuentes JM, Fahnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I (2005) Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *Faseb Journal* 19:1000-+
- Kupkova Z, Benes L (2004) Chemical properties, biological effects and methods of detection of nitric oxide. *Chemicke Listy* 98:116-122
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W (2003) Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology* 11:210-214
- Lerner EA, Ribeiro JMC, Nelson RJ, Lerner MR (1991) Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary-glands of the sand fly *Lutzomyia-longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry* 266:11234-11236
- Liew FY, Li Y, Millott S (1990a) Tumor-necrosis-factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania-major* through the induction of nitric-oxide. *Journal of Immunology* 145:4306-4310
- Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RMJ, Moncada S (1990b) Macrophage killing of leishmania parasite in vivo is mediated by nitric-oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* 144:4794-4797
- Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M (1990c) Tumor-necrosis-factor (TNF-alpha) in leishmaniasis .1. TNF-alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 69:570-573
- Liew FY, Wei X, Proudfoot L (1997) Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 352:1311-1315
- Lima HC, Titus RG (1996) Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64:5442-5445

- Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ (2000) Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *Journal of Immunology* 164:436-442
- Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG (1998) *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 161:5571-5577
- McConville MJ, Blackwell JM (1991) Developmental-changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani* - characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *Journal of Biological Chemistry* 266:15170-15179
- McConville MJ, Ferguson MAJ (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochemical Journal* 294:305-324
- McConville MJ, Thomasoates JE, Ferguson MAJ, Homans SW (1990) Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania-major*. *Journal of Biological Chemistry* 265:19611-19623
- Moine OL, Stordeur P, Schandene L, Marchant A, Groote D, Goldman M, Deviere J (1996) Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *The Journal of Immunology* 156:4408-4414
- Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG (2001) Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against L-major infection. *Journal of Immunology* 167:5226-5230
- Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17:138-146
- Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* 73:209-212
- Munder M, Eichmann K, Modolell M (1998) Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase arginase balance: Competitive regulation by CD4(+) T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *Journal of Immunology* 160:5347-5354
- Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M (2003) From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiologica Scandinavica* 179:123-135
- Murray HW, Cartelli DM (1983) Killing of intracellular *Leishmania-donovani* by human mononuclear phagocytes - evidence for oxygen-dependent and oxygen-independent leishmanicidal activity. *Journal of Clinical Investigation* 72:32-44
- Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD (1983) Killing of intracellular *Leishmania-donovani* by lymphokine stimulated human mononuclear phagocytes - evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *Journal of Clinical Investigation* 72:1506-1510
- Naderer T, McConville MJ (2008) The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular Microbiology* 10:301-308
- Norsworthy NB, Sun JR, Elnaïem D, Lanzaro G, Soong L (2004) Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulation interleukin-10 production. *Infection and Immunity* 72:1240-1247
- Patel S, Sethi A (2009) Imported tropical diseases. *Dermatologic Therapy* 22:538-549
- Peck A, Mellins ED (2010) Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 129:147-153
- Podofil JR, Miller SD (2009) Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. *Immunological Reviews* 229:337-355

- Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei XQ, Ferguson MAJ, Brimacombe JS, Liew FY (1996) Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:10984-10989
- Proudfoot L, Odonnell CA, Liew FY (1995) Glycoinositolphospholipids of *Leishmania*-major inhibit nitric-oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine MACROPHAGES. *European Journal of Immunology* 25:745-750
- Puentes SM, Dasilva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania*-major promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of Immunology* 145:4311-4316
- Qureshi AA, Asahina A, Ohnuma M, Tajima M, Granstein RD, Lerner EA (1996) Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54:665-671
- Reed SG (1999) TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes and Infection* 1:1313-1325
- Ribeiro JMC, Katz O, Pannell LK, Waitumbi J, Warburg A (1999) Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *Journal of Experimental Biology* 202:1551-1559
- Ribeiro JMC, Rossignol PA, Spielman A (1986) Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 83:683-686
- Rohousova I, Volf P (2006) Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica* 53:161-171
- Roport C, Gazzinelli RT (2000) Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidyl inositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology* 3:395-403
- Ruco LP, Meltzer MS (1978) Macrophage activation for tumor cytotoxicity - tumoricidal activity by macrophages from C3H-HEJ mice requires at least 2 activation stimuli. *Cellular Immunology* 41:35-51
- Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM (1990) Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin-4 monoclonal-antibody - evidence for a T-cell dependent, interferon-gamma independent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* 171:115-127
- Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R (1991) A mouse model of *Leishmania-braziliensis-braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine* 173:49-54
- Schebesch C, Kodelja V, Muller C, Hakij N, Bisson S, Orfanos CE, Goerdts S (1997) Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4(+) T cells in vitro. *Immunology* 92:478-486
- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis - T-cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T-helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine* 168:1675-1684
- Sharma U, Singh S (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases* 45:255-272

- Soares MBP, Titus RG, Shoemaker CB, David JR, Bozza M (1998) The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *Journal of Immunology* 160:1811-1816
- Song EW, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang MH, Exton MS (2000) Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular Immunology* 204:19-28
- Soroosh P, Doherty TA (2009) Th9 and allergic disease. *Immunology* 127:450-458
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992) Interleukin-4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity - a marker of alternative immunological macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* 176:287-292
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric-oxide synthase - an FAD-containing and FMN-containing flavoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7773-7777
- Stuehr DJ, Marletta MA (1987) Induction of nitrite nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *Journal of Immunology* 139:518-525
- Sypek JP, Chung CL, Mayor SEH, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis - interleukin-12 initiates a protective T-helper type-1 immune-response. *Journal of Experimental Medicine* 177:1797-1802
- Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RBB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, Silva JS, Guglielmotti A, Miranda JC, Barral A, Brodskyn C, Barral-Netto M (2005) Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *Journal of Immunology* 175:8346-8353
- Tesh RB, Guzman H (1996) Sand Flies and the Agents They Transmit. *The biology of disease vectors* 9:117-127
- Theodos CM, Ribeiro JMC, Titus RG (1991) Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on leishmania infection in mice. *Infection and Immunity* 59:1592-1598
- Theodos CM, Titus RG (1993) Salivary-gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in-vitro. *Parasite Immunology* 15:481-487
- Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology* 28:131-141
- Titus RG, Ribeiro JMC (1988) Salivary-gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance leishmania infectivity. *Science* 239:1306-1308
- Titus RG, Sherry B, Cerami A (1989) Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* 170:2097-2104
- Volf P, Myskova J (2007) Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology* 23:91-92
- Waitumbi J, Warburg A (1998) *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infection and Immunity* 66:1534-1537

- Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F (1994) Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 345:223-230
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng CJ, Huang FP, Xu DM, Muller W, Moncada S, Liew FY (1995) Altered immune-responses in mice lacking inducible nitric-oxide synthase. *Nature* 375:408-411
- WHO (duben, 2010) <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- Winberg ME, Rasmusson B, Sundqvist T (2007) *Leishmania donovani*: Inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages. *Experimental Parasitology* 117:165-170
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding AH, Troso T, Nathan C (1992) Cloning and characterization of inducible nitric-oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228
- Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A (2001) Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International Journal for Parasitology* 31:810-814
- Zhu J, William E Paul (2010) Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research* 20:4-12